

BIFUNCTIONALIZED POLYSACCHARIDES

Publication number: WO2007116143 (A1)

Publication date: 2007-10-18

Inventor(s): SOULA GERARD [FR]; SOULA REMI [FR]; SOULA OLIVIER [FR]

Applicant(s): PROTEINS PEPTIDES MAN [FR]; SOULA GERARD [FR]; SOULA REMI [FR]; SOULA OLIVIER [FR]

Classification:


- international: C08B37/00; A61K47/36; C08B15/06; C08B37/02; C08B37/04; C08B37/08; C08B37/14; C08B37/00; A61K47/36; C08B15/00


- European: A61K9/00M5; C08B11/20; C08B15/06; C08B37/00; C08B37/00M2F; C08B37/00M3B2; C08B37/00M5; C08B37/00P2D; C08B37/00P2F; C08B37/00P4


Application number: WO2007FR00595 20070406


Priority number(s): FR20060003130 20060407; US20060790532P 20060410


Also published as:

 US2008014250 (A1)

 KR20090013179 (A)


 EP2007816 (A1)


 CN101460523 (A)


 CA2648395 (A1)


[more >>](#)


Cited documents:

 US5750678 (A)

 WO0016818 (A1)

 WO9220349 (A1)

 US2931753 (A)

 US2001021758 (A1)

[more >>](#)

Abstract of WO 2007116143 (A1)

The invention concerns a dextran and/or dextran derivative bifunctionalized by at least one imidazolyl radical (Im) and at least one hydrophobic group (Hy), said radical and group being each, identical and/or different, and, grafted or bound to the dextran and/or dextran derivative by one or more linker arms R, Ri or Rh and functions F, Fi or Fh as well as pharmaceutical compositions comprising one of said dextrans and at least one active principle.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 octobre 2007 (18.10.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/116143 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C08B 37/00 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)
C08B 15/06 (2006.01) C08B 37/14 (2006.01)
C08B 37/02 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)
C08B 37/04 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2007/000595

(22) Date de dépôt international : 6 avril 2007 (06.04.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

06/03130 7 avril 2006 (07.04.2006) FR
60/790,532 10 avril 2006 (10.04.2006) US

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : PRO-
TEINS PEPTIDES MANAGEMENT [FR/FR]; 115, av-
enue Lacassagne, F-69003 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : SOULA,
Gérard [FR/FR]; 33, rue Nungesser, F-69330 Meyzieu
(FR). SOULA, Rémi [FR/FR]; 22, rue Bouteille, F-69001
Lyon (FR). SOULA, Olivier [FR/FR]; 115, avenue du Car-
reau, F-69330 Meyzieu (FR).

(74) Mandataires : TRIPOZ, Inès etc.; Cabinet Lavoix, 62,
rue de Bonnel, F-69448 Lyon Cedex 03 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: BIFUNCTIONALIZED POLYSACCHARIDES

(54) Titre : POLYSACCHARIDES BIFONCTIONNALISÉS

(57) Abstract: The invention concerns a dextran and/or dextran derivative bifunctionalized by at least one imidazolyl radical (Im) and at least one hydrophobic group (Hy), said radical and group being each, identical and/or different, and, grafted or bound to the dextran and/or dextran derivative by one or more linker arms R, Ri or Rh and functions F, Fi or Fh as well as pharmaceutical compositions comprising one of said dextrans and at least one active principle.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un dextran et/ou dérivé de dextran bifonctionnalisé par au moins un radical imidazo-
lyle Im et au moins un groupement hydrophobe Hy, lesdits radical et groupement étant chacun, identique et/ou différent, et, greffés
ou liés au dextran et/ou dérivé de dextran par un ou plusieurs bras de liaison R, Ri ou Rh et fonctions F, Fi ou Fh et les compositions
pharmaceutiques comprenant l'un desdits dextrans et au moins un principe actif.

WO 2007/116143 A1

Polysaccharides bifonctionnalisés

La présente invention concerne de nouveaux polymères biodégradables, à base de polysaccharides et plus particulièrement de dextrans.

5 Ces polymères sont utiles notamment pour l'administration de principe(s) actif(s) (PA) aux hommes ou aux animaux dans un but thérapeutique et/ou prophylactique. Ces polymères peuvent également servir pour potentialiser et protéger des principes actifs endogènes.

10 Ces polymères ont été conçus pour répondre à plusieurs applications :

- la libération systémique de PA tels que des protéines comme l'insuline, l'hormone de croissance,
- la libération locale de PA tels que des facteurs de croissance comme les Transforming Growth Factors ou les Bone Morphogenic Proteins,
- 15 • la culture cellulaire *in vitro*,
- l'implantation *in vivo* de cellules,
- la cicatrisation dans laquelle les PA sont des facteurs de croissance endogènes.

Malgré les recherches effectuées dans ces domaines, de nombreux problèmes subsistent pour chacune de ces applications. Tout d'abord, en ce qui concerne la libération systémique de protéines, il serait souhaitable de maintenir constante la concentration du PA sur une durée importante. Or dans le cas du produit Lantus pour l'insuline par exemple, la concentration est variable au cours de la journée pouvant conduire à des hyperglycémies. Dans le cas de l'administration de facteurs de croissance qui sont de puissants agents thérapeutiques locaux, un des problèmes majeurs consiste à les maintenir sur leur site d'administration afin d'éviter leur circulation systémique comme cela est résumé dans l'article de Seeherman, Cytokines and Growth Factors Reviews, 2005, 16, 329-345. Dans le cas de la culture cellulaire, l'apport de facteurs de croissance est reconnu pour être bénéfique. Cependant en raison de la faible stabilité de ces molécules en solution, de grandes quantités de ces agents onéreux doivent être utilisées.

Il existe donc un besoin non satisfait de compositions pharmaceutiques permettant :

- d'étendre le temps de libération de PA systémiques telles que l'insuline ou l'hGH,
- de retenir le principe actif au site d'administration par exemple dans le cas où le PA est un facteur de croissance,
- 5 • de limiter la quantité de PA, en général des facteurs de croissance, employée dans la culture cellulaire,
- de favoriser l'action de PA endogènes notamment dans le cas de la cicatrisation.

10 Malgré les nombreuses tentatives de développement de nouveaux polymères pour atteindre ces objectifs médicaux, seuls les PLAGA ont été approuvés à ce jour dans le domaine du « Drug Delivery ». Ces polymères forment, en milieu aqueux, des solides denses qui contiennent le PA. Dans ce cas, le PA peut être libéré durant plusieurs semaines ce qui est un des objectifs
15 recherchés. Un exemple de formulation est la Nutropin Depot développée par Alkermes et Genentech pour la libération prolongée (2 semaines) de l'hormone de croissance humaine décrit dans le brevet WO 95/29664.

Cependant, cette approche souffre de nombreuses faiblesses telles que :

- 20 • un effet dit « burst » c'est-à-dire qu'une partie significative du PA est libérée immédiatement après l'injection.
- une dégradation chimique du polymère PLAGA qui forme des acides lactiques et glycoliques au sein du solide lesquelles catalysent la dégradation du polymère, ainsi que dans certains cas, celle du PA.
- 25 • L'augmentation locale de l'acidité est source d'inflammation. Ces deux phénomènes sont décrits dans l'article d'Anderson, Adv. Drug Del. Rev., 1997, 28, 5-24.

30 Pour toutes ces raisons, la Nutropin Depot a été récemment retirée du marché.

Atrix décrit dans le brevet US 5,990,194 l'utilisation de PLAGA pour la libération d'un peptide, le leuprolide sous le nom d'Atrigel qui est une formulation à base de solvant organique. En plus des problèmes liés au
35 PLAGA mentionnés ci-dessus, cette technologie présente les défauts suivants :

- L'injection d'un solvant organique. Dans le cas de l'Atrigel, ce solvant est classé parmi les composés CMR.
- Ce système s'applique difficilement aux protéines à cause de l'effet dénaturant de la NMP.

5

D'autres formulations à visée de libération contrôlée de PA pharmaceutiques emploient des polymères réticulables, mais en dépit de nombreux efforts de recherche, aucun biomatériau impliqué dans des compositions pharmaceutiques ne permet de résoudre à la fois l'exigence de l'injectabilité et celle de la rétention au site d'administration du principe actif pour contrôler sa libération systémique ou locale.

La présente invention concerne de nouveaux polysaccharides et plus particulièrement de dextrans, bifonctionnalisés par au moins un radical imidazolyle Im et au moins un groupement hydrophobe Hy qui permettent de satisfaire les applications visées ci-dessus qui n'ont pas trouvé de solution à ce jour. Parmi les polysaccharides fonctionnalisés, on connaît du brevet WO99/09067 des pectins (galacturonanes) dont les acides sont modifiés par des amines, et notamment, une amine porteuse d'un noyau imidazole. Ces polymères mono-fonctionnalisés ne sont pas amphiphiles.

D'autres polysaccharides monofonctionnalisés par des groupements hydrophobes sont connus de l'homme de l'art. Les travaux d'Akiyoski et al. (J. Controlled Release 1998, 54, 313-320) décrivent des pullulans modifiés par du cholestérol pour la libération contrôlée de l'insuline.

Dellacherie et al. décrivent des dérivés du hyaluronane modifiés par des chaînes alkyles grasses en C12 ou C18 dans le brevet FR2794763. Cette équipe a également décrit dans le brevet FR2781677 des dérivés de l'alginate modifiés par des chaînes alkyles grasses.

Parmi les dextrans fonctionnalisés, les carboxymethyldextrans de Biodex décrits dans le brevet US6,646,120 sont modifiés par la benzylamine qui est un groupement hydrophobe. Ces polymères ne sont pas fonctionnalisés par un radical imidazolyle.

Dellacherie et al. ont également décrits des dextrans fonctionnalisés par un hydrophobe (Durand, A. et al., *Biomacromolecules* 2006, 7, 958-964.)(Durand, Alain et al., *Colloid Polym.Sci.* 2006, 284, 536-545.)

obtenus par réaction des fonctions hydroxyles du dextran sur des epoxydes (phenylglycidyl ether, 1,2-epoxyoctane ou 1,2-epoxydodecane). Les polymères décrits ne sont donc pas bifonctionnalisés et n'ont pas de radical imidazolye.

Bauer et al. décrivent des dextrans fonctionnalisés par des acides gras, C10 à C14, dans le brevet US5,750,678. Ces polymères sont également monofonctionnalisés.

Une revue récente des polymères fonctionnels à base de dextrans (Heinze, Thomas *et al.*, *Adv Polym Sci* **2006**, *205*, 199-291.) ne fait pas état de dextran bifonctionnalisé par un hydrophobe et un radical imidazolye.

10

On connaît également de WO92/20349, des compositions insolubles dans l'eau par modification chimique de polysaccharides anioniques par des nucléophiles. Parmi les nucléophiles, figurent l'histidine et certains de ses dérivés mais ces polymères sont monofonctionnels.

15

Ainsi aucun polysaccharide, et plus particulièrement aucun dextran bifonctionnalisé selon l'invention n'est connu de l'art antérieur.

L'invention concerne donc un polysaccharide bifonctionnalisé par au moins un radical imidazolye Im et au moins un groupement hydrophobe Hy, lesdits radical et groupement étant chacun, identique et/ou différent, et, greffés ou liés au polysaccharide par un ou plusieurs bras de liaison R, Ri ou Rh et fonctions F, Fi ou Fh,

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide selon l'invention est choisi dans le groupe constitué par les hyaluronanes, les alginates, les chitosans, les galacturonanes, la chondroïtin-sulfate, les dextrans, les carboxyméthyl dextrans ou les carboxyméthylcelluloses.

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide selon l'invention est choisi dans le groupe constitué par les hyaluronanes, les alginates, les chitosans, les carboxyméthyl dextrans.

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide selon l'invention est choisi dans le groupe constitué par les dextrans, les carboxyméthyl dextrans.

L'invention concerne donc un dextran et/ou dérivé du dextran, bifonctionnalisé par au moins un radical imidazolyle Im et au moins un groupement hydrophobe Hy, lesdits radical et groupement étant chacun, identique et/ou différent, et, greffés ou liés au dextran et/ou dérivé du dextran par un ou plusieurs bras de liaison R, Ri ou Rh et fonctions F, Fi ou Fh,

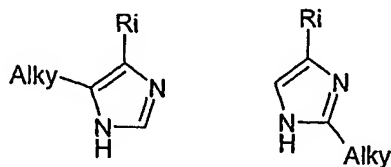
- R représente un bras de liaison constitué d'une liaison chimique ou d'une chaîne comprenant entre 1 et 18 atomes de carbone, éventuellement branchée et/ou insaturée comprenant un ou plusieurs hétéroatomes, tels que O, N ou/et S,

R sera dénommé Ri lorsqu'il porte un radical imidazolyle et Rh lorsqu'il porte un groupement hydrophobe, Ri et Rh étant identiques ou différents,

- F représente une fonction choisie parmi les fonctions ester, thioester, amide, carbonate, carbamate, éther, thioéther ou amine,

F sera dénommé Fi lorsqu'elle porte un radical imidazolyle et Fh lorsqu'elle porte un groupement hydrophobe, Fi et Fh étant identiques ou différents.

- Im représente un radical imidazolyle, éventuellement substitué sur l'un des carbones par un groupement alkyle (Alky) en C1 à C4, de formule



- Hy représente un groupement hydrophobe choisi parmi les groupements :

- alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes tels que O, N ou S.

- alkylaryle ou arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant éventuellement un hétéroatome
- polycyclique en C8 à C30 éventuellement insaturé,

5

ledit dextran et/ou dérivé du dextran étant amphiphile lorsqu'il est en solution.

Dans un mode de réalisation, il est amphiphile à pH acide.

10

On entend par dextran selon l'invention dans la suite du texte le dextran et les dérivés de dextran.

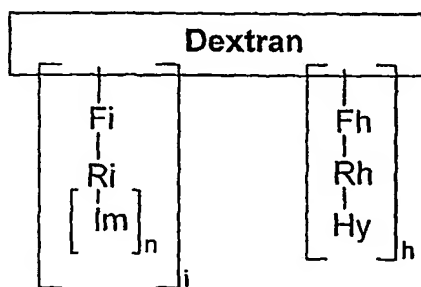
Les dérivés de dextran sont dans un mode de réalisation choisis parmi les dérivés carboxylés.

15

Les dérivés carboxylés du dextran sont plus particulièrement choisis parmi les carboxyméthyldextrans et les produits de réaction entre l'anhydride succinique et le dextran.

20

Selon l'invention le dextran et/ou dérivé du dextran bifonctionnalisé peut répondre aux formules générales suivantes :



Formule I

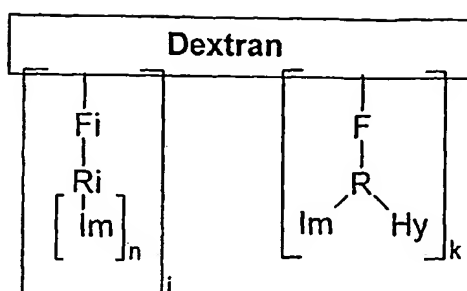
25

n est compris entre 1 et 3,

i représente la fraction molaire de radical imidazolyle par rapport à une unité monosaccharidique, comprise entre 0.1 et 0.9,

h représente la fraction molaire de groupement hydrophobe par rapport à une unité monosaccharidique comprise entre 0.01 et 0.5.

30



Formule II

- 5 n est compris entre 1 et 3,
 i représente la fraction molaire de radical imidazolyle par rapport à
 une unité monosaccharidique, comprise entre 0 et 0.9,
 k représente la fraction molaire de groupement hydrophobe par
 rapport à une unité monosaccharidique comprise entre 0.01 et 0.5.

10

De façon surprenante, les dextrans bifonctionnalisés par au moins
 un radical imidazolyle et au moins un groupe hydrophobe selon l'invention
 prennent en masse à pH physiologique tout en permettant la rétention du PA
 dans le polymère. Ainsi, les principes actifs sont retenus au site d'injection in
 15 vivo sans être ni dégradés ni dénaturés.

Par prise en masse, il est entendu que le polymère peut soit former
 un solide, soit former un hydrogel.

- 20 Un hydrogel est un type de colloïde obtenu en milieu aqueux, dans
 lequel un liquide contient un solide formant un fin réseau qui s'étend dans tout
 le système. Les phases solides et liquides y sont continues.

- Deux types de dextrans bifonctionnalisés répondent à cette
 25 invention, les dextrans cationiques et les dextrans anioniques.

Les dextrans cationiques selon l'invention ont la propriété de former
 une solution homogène dans un intervalle de pH inférieur à 6, et de prendre en
 masse à pH proche du pH physiologique.

A pH voisin du pH physiologique, tout ou partie des segments imidazoles chargés et donc hydrophiles va se transformer en segments neutres, ce qui entraîne sa prise en masse.

5 Cet effet de prise en masse peut être combiné avec un effet de réticulation physique par coordination des noyaux imidazolyles du polymère, et éventuellement présents sur le principe actif, à des métaux de transition polyvalents tels que le zinc. Cette coordination n'a lieu qu'à pH supérieur à 6.

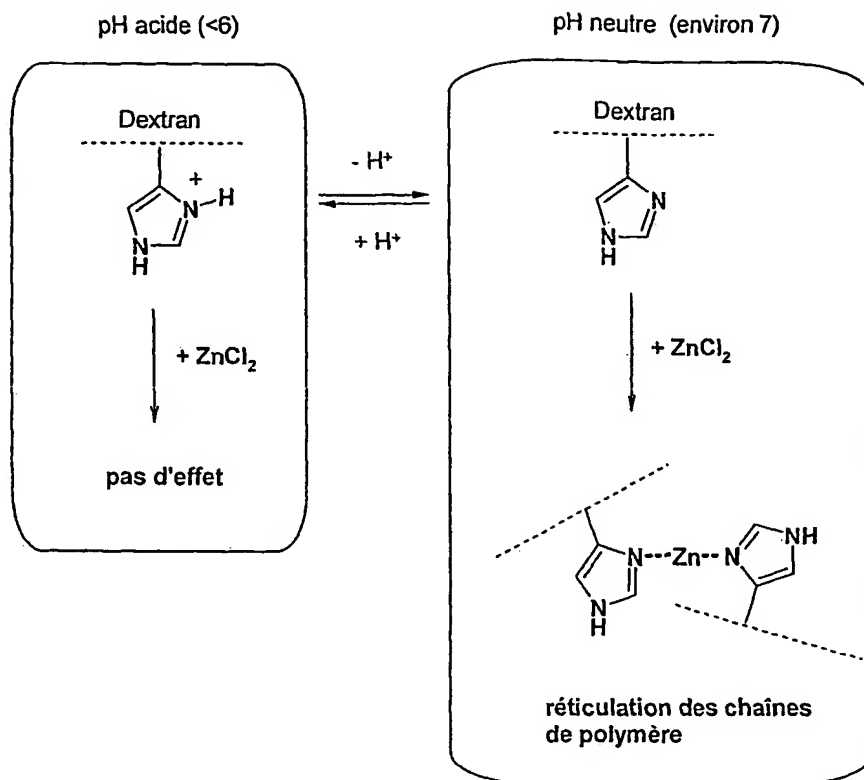
10 Les dextrans anioniques selon l'invention ont la propriété de former une solution homogène à pH neutre et de prendre en masse à pH proche du pH physiologique en présence de sels de métaux de transition.

15 Lorsqu'ils forment une solution homogène, les dextrans selon l'invention sont amphiphiles et donc solubilisés sous forme de micelles et/ou de nanoparticules.

A pH voisin du pH physiologique, la prise en masse induite par un effet de réticulation physique se produit par coordination des noyaux imidazole du polymère, et éventuellement présents sur le principe actif, à des métaux de transition polyvalents tels que le zinc.

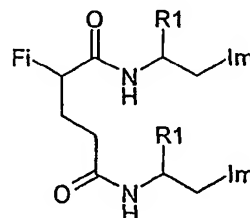
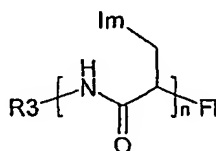
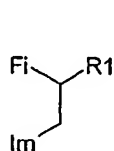
20

Le schéma suivant représente le mode d'action des sels de métaux à pH physiologique avec les imidazoles portés par le polymère ou le PA.



En fonction des propriétés des polymères permettant d'obtenir les prises en masse à pH physiologique, les formulations injectables seront réalisées dans les zones de pH dans lesquelles lesdits polymères forment une solution homogène.

Dans un mode de réalisation, le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que le groupe Ri, lorsqu'il n'est pas une
10 liaison est choisi dans les groupes suivants :



R1 = H, COOH, COOR2, CONH2

$n = 1-6$
 $R3 = H, R2, Hy$

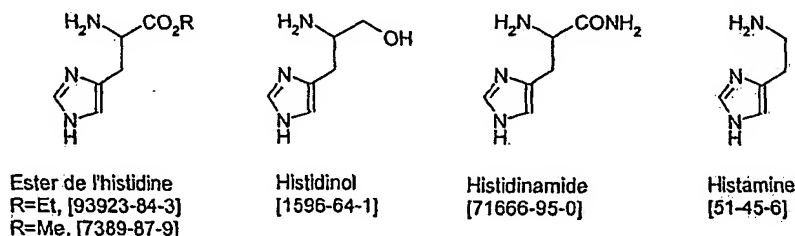
R2 étant choisi parmi les radicaux alkyle comprenant de 1 à 18 atomes de carbone.

Dans un mode de réalisation le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que le groupe Ri est une liaison.

Dans un mode de réalisation, le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que le groupement Imidazole-Ri est choisi parmi les groupements obtenus par greffage d'un ester de l'histidine, de l'histidinol, de l'histidinamide ou de l'histamine.

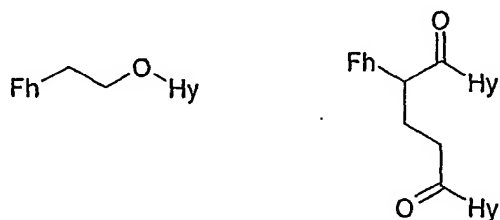
Ces dérivés de l'imidazole peuvent être représentés comme suit :

10



Dans un mode de réalisation, le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que Hy sera choisi dans le groupe constitué par les acides gras, les alcools gras, les amines grasses, les dérivés du cholestérol dont l'acide cholique, les phénols dont l'alpha-tocophérol.

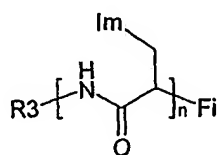
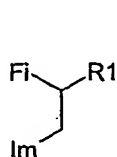
Dans un mode de réalisation, le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que le groupe Rh lorsqu'il n'est pas une liaison est choisi dans les groupes :



Dans un mode de réalisation le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que le groupe Rh est une liaison.

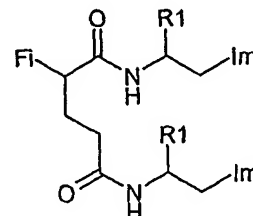
11

Dans un mode de réalisation le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que le groupe Ri, lorsqu'il n'est pas une liaison est choisi dans les groupes



n = 1-6

R3 = H, R2, Hy



5. R1 = H, COOH, COOR2, CONH2

R2 étant choisi parmi les radicaux alkyle comprenant de 1 à 18 atomes de carbone.

et le groupe Rh est une liaison.

10

Dans un mode de réalisation, le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que le groupement Imidazole-Ri est choisi parmi les esters de l'histidine, l'histidinol, l'histidinamide ou l'histamine.

15 Dans un mode de réalisation, le dextran et/ou dérivé de dextran selon l'invention est caractérisé en ce que Hy sera choisi dans le groupe constitué par les acides gras, les alcools gras, les amines grasses, les dérivés du cholestérol dont l'acide cholique, les phénols dont l'alpha-tocophérol, les acides aminés hydrophobes.

20 Les acides aminés hydrophobes sont choisis parmi les dérivés du tryptophane tel que l'ester éthylique du tryptophane, les dérivés de la phénylalanine, les dérivés de la leucine, les dérivés de la valine, les dérivés de l'isoleucine.

25 Le dextran et/ou dérivé de dextran peut avoir un degré de polymérisation m compris entre 10 et 10000.

Dans un mode de réalisation il a un degré de polymérisation m compris entre 10 et 1000.

Dans un autre mode de réalisation il a un degré de polymérisation m compris entre 10 et 500.

30

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant l'un des dextrans et/ou dérivés de dextran selon l'invention tel que décrit précédemment et au moins un principe actif.

On entend par principe actif un produit sous forme d'entité chimique unique ou sous forme d'une combinaison ayant une activité physiologique. Ledit principe actif peut être exogène c'est à dire qu'il est apporté par la composition selon l'invention. Il peut également être endogène, par exemple les facteurs de croissance qui vont être sécrétés dans une plaie pendant la première phase de cicatrisation et qui pourront être retenus sur ladite plaie par la composition selon l'invention.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant l'un des dextrans et/ou dérivés de dextran selon l'invention tel que décrit précédemment et un sel de métal de transition.

Dans un mode de réalisation le métal de transition est choisi dans le groupe constitué par le zinc, le fer, le cuivre et le cobalt.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'une solution homogène ou d'une suspension dans l'eau à pH inférieur à 6.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment caractérisée en ce que la solution homogène et/ou la suspension à pH inférieur 6 est constituée de micelles et/ou nanoparticules. On entend par nanoparticules des objets en suspension dans l'eau dont le diamètre moyen est inférieur à 600 nm.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'une suspension de microparticules dans l'eau à pH voisin du pH physiologique. On entend par microparticules des objets dont le diamètre moyen est supérieur à 600 nm et par pH voisin du pH physiologique, un pH compris entre 6 et 8.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment caractérisée en ce qu'elle est administrable par voie intraveineuse, intramusculaire, intraosseuse, sous-cutanée, transdermique, oculaire.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment caractérisée en ce qu'elle est administrable par voie orale, nasale, vaginale, buccale.

5 L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme solide.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment, caractérisée en ce qu'elle est
10 obtenue par prise en masse contrôlée par le pH.

Dans un mode de réalisation la prise en masse est réalisée à pH supérieur à 6,5.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment, caractérisée en ce qu'elle est
15 obtenue par séchage et/ou lyophilisation.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment, caractérisée en ce qu'elle est administrable sous forme de stent, de film ou « coating » de biomatériaux implantables, d'implant.
20

L'invention concerne également une composition telle que décrite précédemment caractérisée en ce qu'elle subit une réticulation physique au site d'injection.

L'invention concerne également une composition telle que décrite
25 précédemment caractérisée en ce qu'elle permet la rétention du principe actif au site d'injection.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont obtenues par les techniques de galénique classiques connues de l'homme de l'art et
30 seront préparées soit industriellement soit extemporanément.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique selon l'invention telle que décrite précédemment caractérisée en ce que le
35 principe actif est choisi dans le groupe constitué par les protéines, les glycoprotéines, les peptides et les molécules thérapeutiques non-peptidiques.

Selon l'invention, les protéines ou glycoprotéines sont choisies parmi les hormones telle que l'insuline, l'hGH, parmi les facteurs de croissance tels que les membres de la super famille des Transforming Growth Factors- β (TGF- β) comme les Bone Morphogenic Proteins (BMP), les Platelet Derived Growth Factors (PDGF), les Insulin Growth Factors (IGF), les Nerve Growth Factors (NGF), les Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), les Fibroblasts Growth Factors (FGF), les Epidermal Growth Factors (EGF), les cytokines du type Interleukines (IL) ou interferons (IFN).

10

Parmi les applications médicales en thérapeutique on peut citer :

- la libération locale de PA tels que des facteurs de croissance comme les TGF, les BMP, les PDGF, les NGF, les VEGF, les IGF, les FGF, les EGF,
- 15 • la libération systémique de PA tels que des protéines comme l'insuline, l'hormone de croissance, l'EPO, les IL, les IFN,
- l'administration in vivo de cellules,
- la culture cellulaire *in vitro*,
- la cicatrisation dans laquelle les PA sont des facteurs de croissance endogènes.

20

Les compositions selon l'invention telles que décrites précédemment dans lesquelles le principe actif est choisi dans le groupe constitué par les protéines, les glycoprotéines, les peptides et les molécules thérapeutiques non-peptidiques, comprennent entre 0.005% et 2% en poids de principe actif par rapport au poids total de la composition.

25

Dans un mode de réalisation, les compositions comprennent entre 0.01% et 0.5% en poids de protéines, glycoprotéines, peptides et molécules thérapeutiques non-peptidiques par rapport au poids total de la composition

30

Parmi les applications médicales citées dans la libération locale de facteurs de croissance, en particulier des BMP, les traitements locaux des os

fragilisés par l'ostéoporose sont visés. Ces traitements consistent à régénérer les os les plus prompts à se casser car soumis à de fortes contraintes physiques, en particulier, les hanches, les poignets et les vertèbres. Ces traitements sont à la fois curatifs dans le cas de fractures et préventifs dans les situations à fort risque.

L'invention concerne ainsi l'utilisation des dextrans et/ou dérivés de dextrans et/ou des compositions selon l'invention pour le traitement ou la formulation de médicaments destinés aux traitements locaux des os fragilisés par l'ostéoporose.

10

Dans ce cas particulier, la composition comprend entre 0.005% et 2% de BMP par rapport au poids total de la composition.

Dans un mode de réalisation, la composition comprend entre 0.01% et 0.5% de BMP par rapport au poids total de la composition

15

Parmi les applications médicales citées dans la libération locale de facteurs de croissance, en particulier des NGF ou des TGF- β , les traitements pour la régénération des tissus nerveux sont visés.

20

L'invention concerne ainsi l'utilisation des dextrans et/ou dérivés de dextrans et/ou des compositions selon l'invention pour le traitement ou la formulation de médicaments destinés à la régénération des tissus nerveux.

Dans ce cas particulier, la composition comprend entre 0.005% et 2% de NGF ou de TGF- β par rapport au poids total de la composition.

25

Dans un mode de réalisation, la composition comprend entre 0.01% et 0.5% de NGF ou de TGF- β par rapport au poids total de la composition

30

Parmi les applications médicales citées dans la libération locale de facteurs de croissance, en particulier des TGF- β , des PDGF ou des VEGF, les traitements pour la régénération des tissus cardio-vasculaires sont visés.

L'invention concerne ainsi l'utilisation des dextrans et/ou dérivés de dextrans et/ou des compositions selon l'invention pour le traitement ou la

35

formulation de médicaments destinés à la régénération des tissus cardiovasculaires.

Dans ce cas particulier, la composition comprend entre 0.005% et 2% de VEGF ou de TGF- β par rapport au poids total de la composition.

5

Dans un mode de réalisation, la composition comprend entre 0.01% et 0.5% de VEGF ou de TGF- β par rapport au poids total de la composition

10

Parmi les applications médicales citées dans la libération locale de facteurs de croissance, en particulier des PDGF ou des FGF, les traitements pour la régénération des tissus de la peau sont visés.

L'invention concerne ainsi l'utilisation des dextrans et/ou dérivés de dextrans et/ou des compositions selon l'invention pour le traitement ou la formulation de médicaments destinés à la régénération des tissus de la peau.

15

Dans ce cas particulier, la composition comprend entre 0.005% et 2% de PDGF ou de FGF par rapport au poids total de la composition.

20

Dans un mode de réalisation, la composition comprend entre 0.01% et 0.5% de PDGF ou de FGF par rapport au poids total de la composition

25

Selon l'invention, les protéines sont choisies dans le groupe constitué par l'insuline ou l'hormone de croissance hGH.

Selon l'invention, les molécules thérapeutiques non-peptidiques sont choisies dans le groupe constitué par les anticancéreux comme le Taxol ou le cis-platine.

30

Dans ce cas particulier, la composition comporte entre 0.005% et 2% d'insuline ou d'hormone de croissance hGH par rapport au poids total de la composition.

Dans un mode de réalisation, la composition comprend entre 0.01% et 0.5% d'insuline ou d'hormone de croissance hGH par rapport au poids total de la composition

35

Selon l'invention le principe actif est choisi dans le groupe des peptides choisis parmi le leuprolide ou des séquences courtes de la ParaThyroïdeHormone (PTH).

5

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention se présentent soit sous forme liquide (nanoparticules ou microparticules en suspension dans l'eau ou dans des mélanges de solvants), soit sous forme de poudre, d'implant, de film, de gels ou de crèmes.

10

Dans le cas des libérations locale et systémique, les modes d'administration envisagés sont par voie sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, orale, nasale, vaginale, oculaire, buccale, etc...

15

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent ainsi être employées pour former un implant contenant un ou plusieurs principes actifs pharmaceutiques pour leur libération contrôlée durant une longue période de temps. Cette application est particulièrement avantageuse pour le traitement des tumeurs solides avec un anticancéreux ou pour la régénération cellulaire.

20

L'invention concerne également une composition pharmaceutique réticulée physiquement au site d'injection comprenant un principe actif choisi dans le groupe constitué par les protéines, les glycoprotéines, les peptides et les molécules thérapeutiques non-peptidiques.

25

L'invention concerne également l'utilisation des dextrans et/ou dérivés de dextrans bifonctionnalisés selon l'invention pour la préparation de compositions pharmaceutiques telles que décrites précédemment.

30

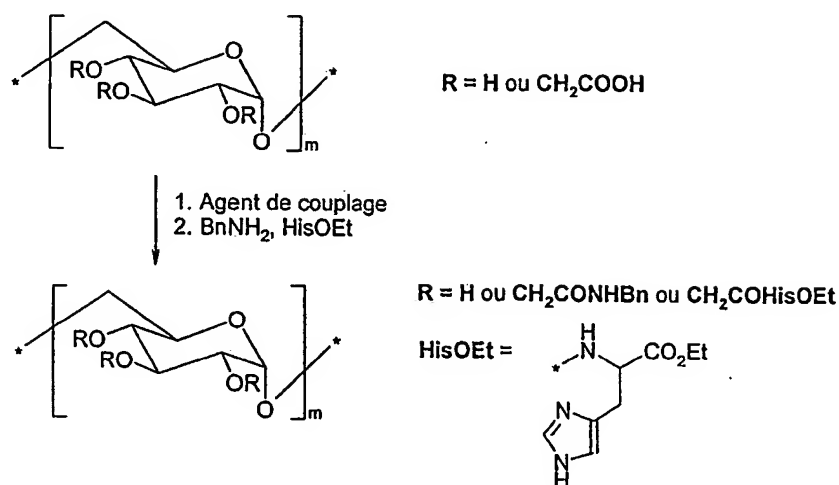
Exemple 1 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et la benzylamine

Les fonctions acides d'un carboxymethyldextran (degré moyen d'acide par unité glycosidique de 1.0) sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans la NMP. La benzylamine puis l'ester éthylique

35

18

de l'histidine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.



5

Le taux de fonctions acides modifiées par :

- l'ester éthylique de l'histidine est de 55%,
- la benzylamine est de 45%

Le taux d'acides non modifiés est nul.

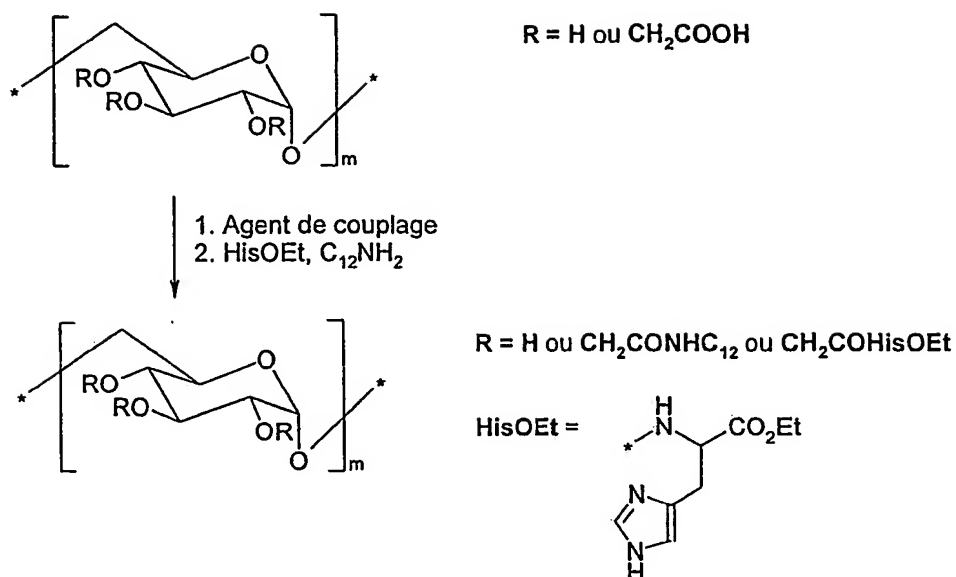
10

Exemple 2 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et la dodécylamine

Les fonctions acides d'un carboxymethyldextran (degré moyen d'acide par unité glycosidique de 1.0) sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans le DMF. L'ester éthylique de l'histidine et la dodécylamine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.

15

19



Le taux de fonctions acides modifiées par :

- l'ester éthylique d'histidine est de 85%
- 5 - la dodécylamine est de 10%

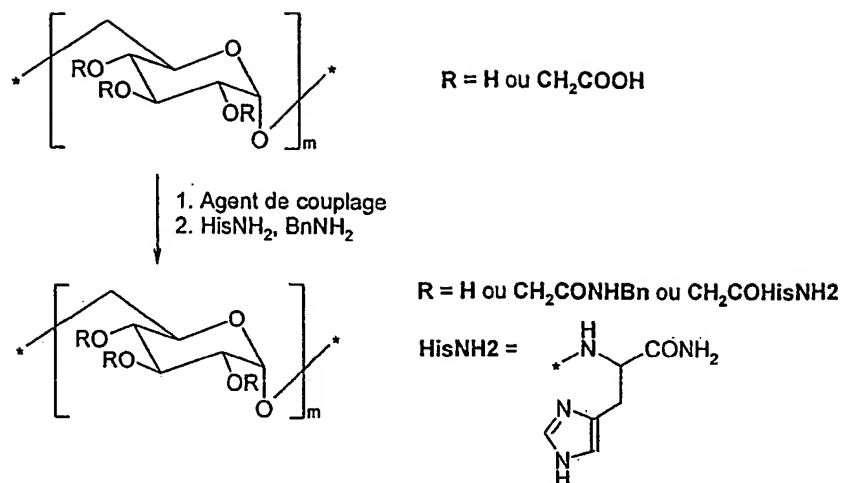
Le taux d'acides non modifiés est de 5%.

Exemple 3 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'histidinamide et la benzylamine

- 10 Les fonctions acides d'un carboxymethyldextran (degré moyen d'acide par unité glycosidique de 1.0) sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans la NMP. L'histidinamide et la benzylamine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.

15

20



Le taux de fonctions acides modifiées par :

- l'histidinamide est de 65%,
- 5 - la benzylamine est de 30%

Le taux d'acides non modifiés est de 5%.

Exemple 4 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et l'ester éthylique du tryptophane

- 10 Les fonctions acides d'un carboxymethyldextran (degré moyen d'acide par unité glycosidique de 1.0) sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans le DMF à 0°C. L'ester éthylique de l'histidine et l'ester éthylique du tryptophane sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu est caractérisé par un taux de fonctions acides modifiées par :
- 15 - l'ester éthylique de l'histidine de 70%,
 - l'ester éthylique du tryptophane de 30%

Le taux d'acides non modifiés est nul.

- 20 Exemple 5 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et l'ester éthylique du tryptophane

Les fonctions acides d'un carboxymethyldextran (degré moyen d'acide par unité glycosidique de 0.7) sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans le DMF à 0°C. L'ester éthylique de l'histidine

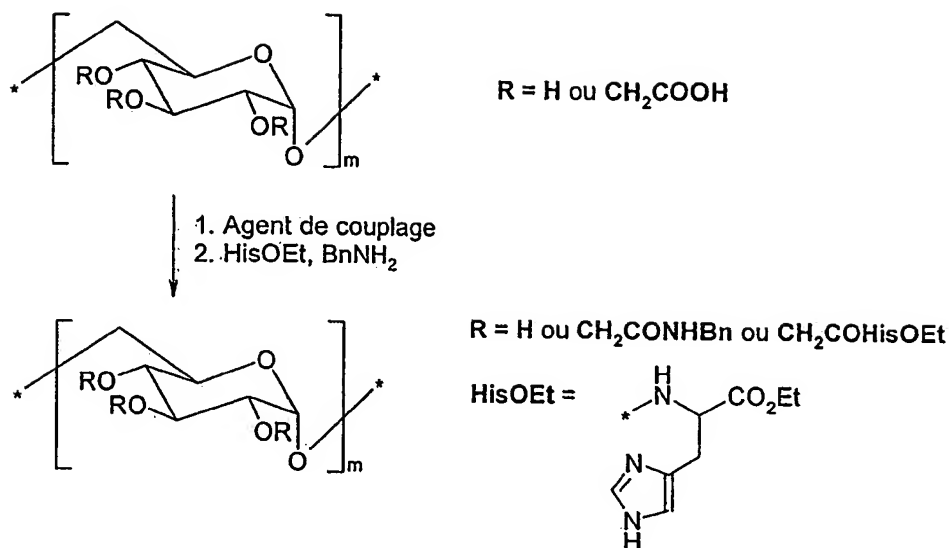
l'ester éthylique du tryptophane sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu est caractérisé par un taux de fonctions acides modifiées par :

- l'ester éthylique de l'histidine de 60%,
- l'ester éthylique du tryptophane de 40%

5 Le taux d'acides non modifiés est nul.

Exemple 6 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et la benzylamine

10 Les fonctions acides d'un carboxymethyldextran (degré moyen d'acide par unité glycosidique de 1.0) sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans le DMF à 0°C. L'ester éthylique de l'histidine et la benzylamine sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.



Le taux de fonctions acides modifiées par :

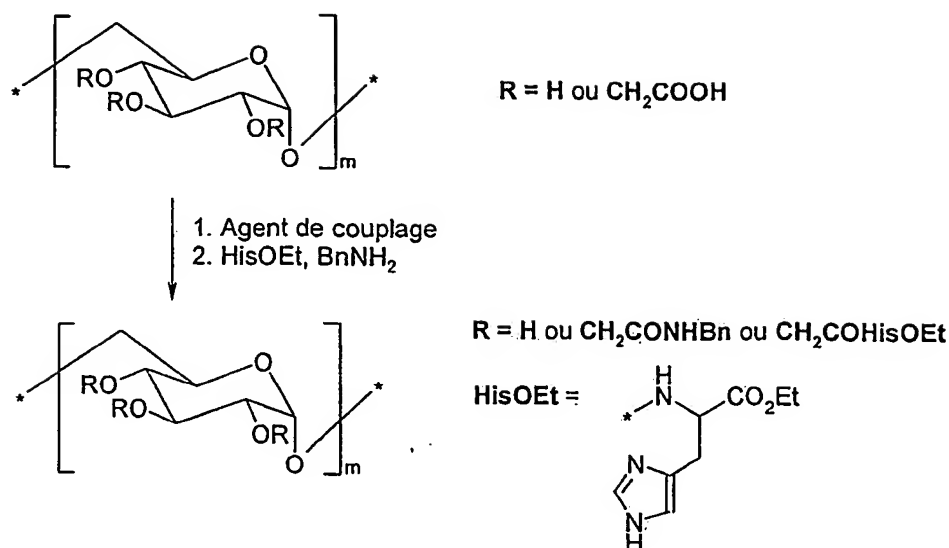
- 5 - l'ester éthylique de l'histidine est de 10%,
- la benzylamine est de 45%

Le taux d'acides non modifiés est de 45%.

Exemple 7 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par l'ester éthylique de l'histidine et la benzylamine

Les fonctions acides d'un carboxymethyldextran (degré moyen d'acide par unité glycosidique de 1.0) sont activées en présence de N-MéthylMorpholine et de chloroformate d'isobutyl dans le DMF à 0°C. L'ester éthylique de l'histidine (0,2 équivalent par rapport aux acides) et la benzylamine (0,45 équivalent par rapport aux acides) sont greffés sur ce polymère activé. Le polymère obtenu a la structure suivante.

23



Le taux de fonctions acides modifiées par :

- l'ester éthylique de l'histidine est de 30%,
- 5 - la benzylamine est de 45%

Le taux d'acides non modifiés est de 25%.

Exemple 8 : Synthèse d'un carboxymethyldextran modifié par la benzylamine

- 10 Le polymère est préparé selon le brevet US6,646,120. Le taux de fonctions acides modifiées par la benzylamine est de 40%.

Exemple 9 : Etude de solubilité des polymères en fonction du pH

- 15 Les polymères décrits dans les exemples précédents (1 à 8) ont été mis en solution à pH acide, pH inférieur à 6. La deuxième colonne du tableau décrit l'état des solutions de polymères à pH acide. Ensuite, ces solutions à pH acide sont dispersées dans un milieu tamponné à pH neutre (tampon PBS). La troisième colonne du tableau décrit l'état des solutions à pH neutre.

Polymère	Dextran bifonctionalisé	à pH acide (<6)	À pH neutre (pH = 7.2)
1-5	Cationique	Homogènes et fluides	Milieu biphasique
6-7	Anionique		Homogènes et fluides
8		Homogène et fluide	Homogène et fluide

Dans le cas des polymères obtenus aux exemples 1 à 5, à pH neutre deux phases coexistent, une de polymère pris en masse et une solution d'eau limpide. Dans le cas des polymères obtenus dans les exemples 6 et 7, il n'y a qu'une seule phase, qui est une solution homogène et plus diluée de polymère. L'absence ou la faible fonctionnalisation du polymère par les noyaux imidazoles ne permet pas la prise en masse à pH neutre.

Exemple 10 : Etude de la prise en masse en présence de ZnCl₂

Les polymères décrits dans les exemples précédents (1 à 8) ont été solubilisés dans l'eau, à pH acide pour les polymères 1 à 5, à pH neutre pour les polymères 6 à 8. Pour les polymères 1 à 5, le ZnCl₂ est ajouté à la solution de polymère à pH acide. Le nombre de ZnCl₂ est de 1 pour 2 imidazoles. Les solutions à pH acide des polymères 1 à 5 contenant le ZnCl₂ sont dispersées dans un milieu tamponné à pH neutre (tampon PBS). Les solutions des polymères 6 à 8 à pH neutre sont dispersées dans un milieu tamponné à pH neutre (tampon PBS) contenant du ZnCl₂. La troisième colonne du tableau décrit l'état des solutions de polymères à pH neutre en présence de ZnCl₂.

Polymère	à pH acide (<6) + ZnCl ₂	À pH neutre
1-5	Homogènes et fluides	Milieu biphasique
6-7		Milieu biphasique
8		Homogène et fluide

La réticulation physique par coordination du zinc par les imidazoles des polymères obtenus aux exemples 1-5 conduit à une prise en masse aussi efficace voire accrue. Les polymères 6 et 7 précipitent en présence des ions

zinc à pH neutre alors qu'ils ne précipitaient pas en absence de ces ions. Le polymère obtenu à l'exemple 8 qui était soluble quel que soit le pH n'est pas sensible à la présence de sel de métal de transition. La faible fonctionnalisation du polymère par les noyaux imidazoles permet la prise en masse par l'intermédiaire du $ZnCl_2$ à pH neutre. En revanche, l'absence de la fonctionnalisation du polymère par les noyaux imidazoles ne permet pas la prise en masse par l'intermédiaire du $ZnCl_2$ à pH neutre.

Exemple 11 : Etude de la distribution des sels de métaux de transition entre le solide et la solution

Afin de pouvoir démontrer que tous les sels de métaux sont bien piégés dans la phase de polymère qui a prise en masse à pH physiologique, la distribution du chlorure de zinc(II) a été étudiée. La solution de ce sel est incolore. Au polymère obtenu à l'exemple 1 solubilisé à pH acide est ajouté un demi équivalent de $ZnCl_2$ par rapport aux imidazoles. La solution est homogène et incolore. Puis, cette solution est dispersée dans un milieu tamponné à pH neutre (tampon PBS). Le précipité qui se forme instantanément est blanc et le surnageant est limpide et incolore. Ce dernier est analysé par extrait sec et confirme l'absence de sel de zinc dans cette phase. Ceci démontre le piégeage quantitatif des sels de métal dans le solide formé par le polymère à pH neutre. Dans le cas du polymère obtenu à l'exemple 8, la solution homogène obtenue à pH neutre contient des sels de zinc.

Exemple 12 : Etude de la séquestration d'une protéine dans le solide formé par le polymère à pH neutre

La séquestration du cytochrome C, protéine rouge, dans les phases de polymère à pH physiologique a été étudiée. Pour cela, une solution du polymère obtenu à l'exemple 1 à pH acide a été préparée (30 mg/ml). Le cytochrome C a été solubilisé à 10 mg/ml. La solution de cette protéine est rouge. A 30 mg du polymère obtenu à l'exemple 1 solubilisé à pH acide sont ajoutés 2 mg de la protéine. La solution est homogène et rouge. Puis, cette solution est dispersée dans un milieu tamponné à pH neutre (tampon PBS). Le

précipité qui se forme instantanément est rouge alors que le surnageant est limpide et incolore. Ceci démontre la séquestration quantitative de la protéine dans le solide formé par le polymère à pH neutre.

Cette expérience a été renouvelée avec succès pour d'autres polymères. En

- 5 revanche, dans le cas du polymère obtenu à l'exemple 8, la solution à pH neutre est rouge et ne contient pas de précipité.

Exemple 13 : Etude de la séquestration d'une protéine dans le solide formé par le polymère à pH neutre en présence de ZnCl₂

- 10 La séquestration du cytochrome C dans les solides à pH physiologique a été étudiée en présence de ZnCl₂. Pour cela, une solution du polymère obtenu à l'exemple 1 à pH acide a été préparée (30 mg/ml). Le cytochrome C a été solubilisé à 10 mg/ml. La solution de cette protéine est rouge. Le ZnCl₂ a été solubilisé à 13.6 mg/ml. A 30 mg du polymère obtenu à l'exemple 1 solubilisé à
- 15 pH acide sont ajoutés 2 mg de la protéine et 6.8 mg de ZnCl₂. La solution acide est homogène et rouge. Puis, cette solution est dispersée dans un milieu tamponné à pH neutre (tampon PBS). Le précipité qui se forme instantanément est rouge alors que le surnageant est limpide et incolore. Ceci démontre la séquestration quantitative de la protéine dans le solide formé par le polymère à
- 20 pH neutre en présence de ZnCl₂.

Cette expérience a été renouvelée avec succès pour les polymères obtenus aux exemples 1-7. Le sel de métal permet donc de former un solide qui emprisonne la protéine grâce à la réticulation physique des chaînes de polymères par coordination zinc/imidazole.

- 25 Exemple 14 : Etude de la séquestration du PDGF-BB dans le solide formé par le polymère à pH neutre en présence de ZnCl₂

La séquestration du PDGF-BB dans le solide à pH physiologique a été étudiée en présence de ZnCl₂. Pour cela, une solution du polymère obtenu à l'exemple 1 a été préparée à pH acide (20 mg/ml). A 100 µl de la solution de polymère à

30 pH acide sont ajoutés 0.02 mg de PDGF-BB et 6.5 mg de ZnCl₂. La solution acide est homogène et limpide. Puis, cette solution est dispersée dans un milieu tamponné à pH neutre (10 volumes de tampon PBS 30 mM). Le

précipité se forme rapidement. Le PDGF-BB contenu dans le surnageant est dosé par ELISA après centrifugation du milieu hétérogène. La concentration en PDGF-BB dans le surnageant est inférieure à 0.2 µg/ml alors qu'elle est de 2 µg/ml dans le contrôle sans polymère. Il y a donc bien une séquestration quasi
5 quantitative de la protéine, supérieure à 90%, dans le solide formé par le polymère à pH neutre en présence de ZnCl₂.

Exemple 15 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + BMP-2

Une solution n° 1 du polymère obtenu à l'exemple 1 à une concentration de 50
10 mg/ml est préparée à pH 5. Une solution n° 2 de BMP-2 à une concentration de 1 mg/ml est préparée à pH 7. L'osmolarité de chaque solution est ajustée à 300 mOsm par l'ajout de NaCl. Ces solutions sont conservées à 4°C. Une heure avant l'injection dans le col du fémur d'un patient, une solution n° 3 est préparée par le mélange de 0.9 ml de la solution n° 1 et de 0.1 ml de la solution
15 n° 2. La solution obtenue est homogène et a un pH proche de 5.

Exemple 16 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + ZnCl₂ + BMP-2

Les solutions n° 1 et 2 telles que décrites dans l'exemple 15 ont leur osmolarité ajustée par ajout de ZnCl₂. Puis la solution finale n°3 est préparée
20 extemporanément de la façon décrite dans l'exemple 15.

Exemple 17 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + BMP-2

La solution finale n°3 telle que décrite dans l'exemple 15, peut être préparée extemporanément à partir du polymère obtenu à l'exemple 1 lyophilisé et de la
25 BMP-2 lyophilisée. L'osmolarité de la solution finale est ajustée à 300 mOsm par ajout de NaCl. Le polymère a un pouvoir tampon et conduit à une solution dont le pH est proche de 5. Cette solution finale est limpide.

Exemple 18 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + ZnCl₂ + BMP-2

30 La solution finale n°3 telle que décrite dans l'exemple 15, peut être préparée extemporanément à partir du polymère obtenu à l'exemple 1 lyophilisé et de la

BMP-2 lyophilisée. Dans ce cas, l'osmolarité de la solution finale est ajustée à 300 mOsm par ajout de ZnCl_2 . Cette solution finale est limpide.

Exemple 19 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + BMP-2

- 5 La formulation peut être préparée extemporanément par la solubilisation de 0.1 mg de BMP-2 lyophilisée dans 1 ml de solution de polymère obtenu à l'exemple 1 à 45 mg/ml, à pH 5 et ajustée à 300 mOsm par l'ajout de NaCl. Cette solution finale est limpide.

- 10 Exemple 20 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + ZnCl_2 + BMP-2

La solution de polymère obtenu à l'exemple 1 à 45 mg/ml et à pH 5 telle que décrit dans l'exemple 17 est ajustée à 300 mOsm par l'ajout de ZnCl_2 . Extemporément 0.1 mg de BMP-2 lyophilisée est dissout dans 1 ml de solution de polymère. Cette solution finale est également limpide.

Exemple 21 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + PDGF-BB

Il s'agit dans ce cas de la préparation d'une formulation de polymère obtenu à l'exemple 1 et de PDGF-BB. Cette formulation est préparée selon l'une des six méthodes décrites dans les exemples 15 à 20. La formulation contient 45 mg
5 de polymère et 0.1 mg de PDGF-BB pour 1 ml de solution. Cette solution est limpide et a un pH proche de 5.

Cette formulation est employée dans le traitement des ulcères de pied de patient diabétique.

10 Exemple 22 : Formulation polymère obtenu à l'exemple 1 + hGH

Il s'agit dans ce cas de la préparation d'une formulation de polymère obtenu à l'exemple 1 et d'hGH. Cette formulation est préparée selon l'une des six méthodes décrites dans les exemples 15 à 20. La formulation contient 45 mg
15 de polymère et 5 mg d'hGH pour 1 ml de solution. Cette solution est limpide et a un pH proche de 5.

Cette formulation est injectée une fois par semaine à des patients.

REVENDICATIONS

- 5 1. Dextran et/ou dérivé du dextran, bifonctionnalisé par au moins un radical imidazolyle Im et au moins un groupement hydrophobe Hy, lesdits radical et groupement étant chacun, identique et/ou différent, et, greffés ou liés au dextran et/ou dérivé du dextran par un ou plusieurs bras de liaison R, Ri ou Rh et fonctions F, Fi ou Fh, caractérisé en ce que :

10

- R représente un bras de liaison constitué d'une liaison chimique ou d'une chaîne comprenant entre 1 et 18 atomes de carbone, éventuellement branchée et/ou insaturée comprenant un ou plusieurs

15

R sera dénommé Ri lorsqu'il porte un radical imidazolyle et Rh lorsqu'il porte un groupement hydrophobe, Ri et Rh étant identiques ou différents,

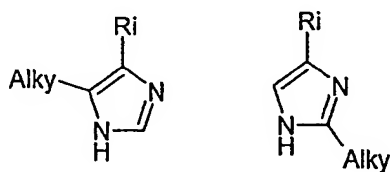
20

- F représente une fonction choisie parmi les fonctions ester, thioester, amide, carbonate, carbamate, éther, thioéther ou amine,

F sera dénommé Fi lorsqu'elle porte un radical imidazolyle et Fh lorsqu'elle porte un groupement hydrophobe, Fi et Fh étant identiques ou différents.

25

- Im représente un radical imidazolyle, éventuellement substitué sur l'un des carbones par un groupement alkyle (Alky) en C1 à C4, de formule



30

- Hy représente un groupement hydrophobe choisi parmi les groupements :

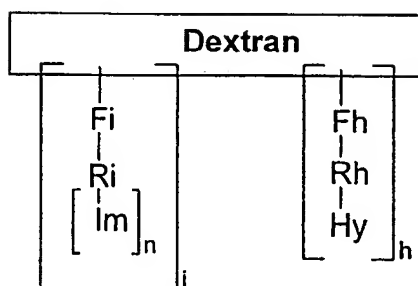
- alkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant un ou plusieurs hétéroatomes tels que O, N ou S.
- alkylaryle ou arylalkyle linéaire ou ramifié en C8 à C30, éventuellement insaturé et/ou contenant éventuellement un hétéroatome
- polycyclique en C8 à C30 éventuellement insaturé,

ledit dextran et/ou dérivé du dextran étant amphiphile lorsqu'il est en solution.

2. Dextran et/ou dérivé du dextran, selon la revendication 1, caractérisé en ce que les dérivés de dextran sont choisis parmi les dérivés carboxylés

3. Dextran et/ou dérivé du dextran, selon la revendication 2, caractérisé en ce que les dérivés carboxylés de dextran sont choisis parmi les carboxyméthyldextrans et les produits de réaction entre l'anhydride succinique et le dextran.

4. Dextran et/ou dérivé du dextran selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale I



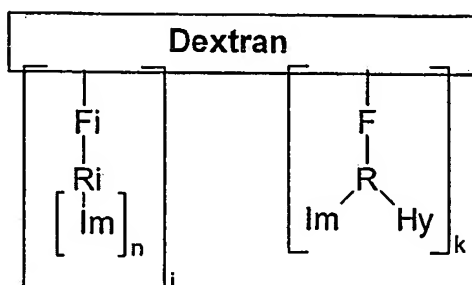
Formule I

n est compris entre 1 et 3,

i représente la fraction molaire de radical imidazolyle par rapport à une unité monosaccharidique, comprise entre 0.1 et 0.9,

h représente la fraction molaire de groupement hydrophobe par rapport à une unité monosaccharidique comprise entre 0.01 et 0.5.

5. Dextran et/ou dérivé du dextran selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale II,



Formule II

10

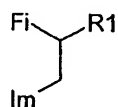
n est compris entre 1 et 3,

i représente la fraction molaire de radical imidazolyte par rapport à une unité monosaccharidique, comprise entre 0 et 0.9,

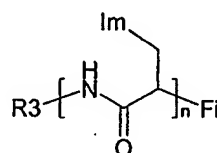
- 15 k représente la fraction molaire de groupement hydrophobe par rapport à une unité monosaccharidique comprise entre 0.01 et 0.5.

20

6. Dextran et/ou dérivé du dextran selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le groupe Ri, lorsqu'il n'est pas une liaison est choisi dans les groupes

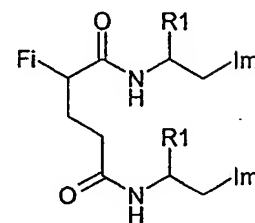


R1 = H, COOH, COOR2, CONH2



n = 1-6

R3 = H, R2, Hy

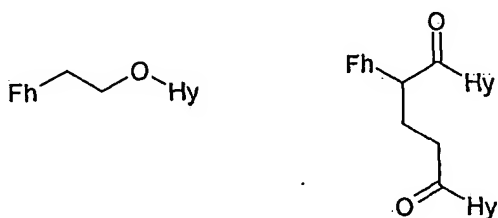


R2 étant choisi parmi les radicaux alkyle comprenant de 1 à 18 atomes de carbone.

25

7. Dextran et/ou dérivé du dextran selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le groupe Ri est une liaison.

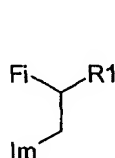
8. Dextran et/ou dérivé du dextran e selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le groupe Rh lorsqu'il n'est pas une liaison est choisi dans les groupes



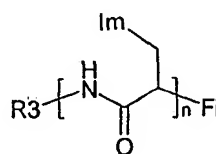
10

9. Dextran et/ou dérivé du dextran e selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le groupe Rh est une liaison.

10. Dextran et/ou dérivé du dextran selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le groupe Ri, est choisi dans les groupes

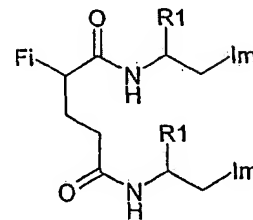


R1 = H, COOH, COOR2, CONH2



n = 1-6

R3 = H, R2, Hy



20

R2 étant choisi parmi les radicaux alkyle comprenant de 1 à 18 atomes de carbone,
et le groupe Rh est une liaison.

11. Dextran et/ou dérivé du dextran selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 6 à 8 caractérisé en ce que le groupement Imidazole-Ri est choisi parmi les esters de l'histidine, l'histidinol, l'histidinamide ou l'histamine.

12. Dextran et/ou dérivé du dextran selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que Hy est choisi dans le groupe constitué par les acides gras, les alcools gras, les amines grasses, les dérivés du cholestérol dont l'acide cholique, les phénols dont l'alpha-tocophérol, les
5 acides aminés hydrophobes.

13. Composition pharmaceutique comprenant l'un des polysaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 et au moins un principe actif.
10

14. Composition pharmaceutique comprenant l'un quelconque des polysaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, et un sel de métal de transition.

15. Composition pharmaceutique selon la revendication 14 caractérisée en ce que le métal de transition est choisi dans le groupe constitué par le zinc, le fer, le cuivre et le cobalt.

16. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'une solution homogène ou d'une suspension dans l'eau à pH inférieur à 6, 5.
20

17. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que la solution homogène et/ou la suspension est constituée de micelles et/ou de nanoparticules.
25

18. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'une suspension de microparticules dans l'eau à pH voisin du pH physiologique.
30

19. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, caractérisée en ce qu'elle est administrable par voie intraveineuse, intramusculaire, intraosseuse, sous cutanée, transdermique,
35 oculaire.

20. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, caractérisée en ce qu'elle est administrable par voie orale, nasale, vaginale, buccale.

5 21. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme solide.

10 22. Composition pharmaceutique selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par prise en masse contrôlée par le pH à pH supérieur à 6.

15 23. Composition pharmaceutique selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle subit une réticulation physique au site d'injection.

 24. Composition pharmaceutique selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle permet la rétention du principe actif au site d'injection.

20 25. Composition pharmaceutique selon la revendication 21, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par séchage et/ou lyophilisation.

25 26. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 21 à 23, caractérisée en ce qu'elle est administrable sous forme de stent, de film ou « coating » de biomatériaux implantables, d'implant, de gel, de crème.

30 27. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 13 à 24, caractérisée en ce que le principe actif est choisi dans le groupe constitué par les protéines, les glycoprotéines, les peptides et les molécules thérapeutiques non-peptidiques.

35 28. Composition pharmaceutique selon la revendication 25, caractérisée en ce que les protéines ou glycoprotéines sont choisies parmi les facteurs de croissance tels que les membres de la super famille des Transforming Growth Factors- β (TGF- β) comme les Bone Morphogenic Proteins (BMP), les Platelet Derived Growth Factors (PDGF), les Insulin

Growth Factors (IGF), les Nerve Growth Factors (NGF), les Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), les Fibroblasts Growth Factors (FGF), les Epidermal Growth Factors (EGF), les cytokines du type des Interleukines (IL) ou interférons (IFN).

5

29. Composition pharmaceutique selon la revendication 27, caractérisée en ce que le principe actif est choisi dans le groupe des peptides choisis parmi le leuprolide ou des séquences courtes de la ParaThyroïdeHormone PTH.

10

30 Composition pharmaceutique selon la revendication 27, caractérisée en ce que le principe actif est choisi dans le groupe des molécules thérapeutiques non-peptidiques telles que les anticancéreux comme le Taxol ou le cis-platine.

15

31. Composition pharmaceutique selon la revendication 27, caractérisée en ce que le principe actif est choisi dans le groupe constitué par l'insuline ou l'hormone de croissance hGH.

20

32. Méthode de traitement ou formulation de médicaments destinés à la régénération des tissus nerveux caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en oeuvre de dextrans et/ou dérivés de dextrans selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 et/ou de compositions selon l'une quelconque des revendications 13 à 31.

25

33. Méthode de traitement ou formulation de médicaments destinés à la régénération des tissus cardiovasculaires caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en oeuvre de dextrans et/ou dérivés de dextrans selon l'une quelconque des revendications 11 à 12 et/ou de compositions selon l'une quelconque des revendications 13 à 31.

30

34. Utilisation des dextrans et/ou dérivés de dextrans et/ou des compositions selon l'une quelconque des revendications 1 à 31, pour le traitement ou la formulation de médicaments destinés à la régénération des

35 tissus de la peau.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C08B37/00 C08B15/06 C08B37/02 C08B37/04 C08B37/08
 C08B37/14 A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 750 678 A (BAUER KURT H [DE] ET AL) 12 May 1998 (1998-05-12) cited in the application column 2, line 49 - line 58; claims -----	1
A	WO 00/16818 A1 (AESCHLIMANN DANIEL [GB]; BULPITT PAUL [GB]) 30 March 2000 (2000-03-30) page 1, line 5 - line 18 page 9, line 25 - line 28 page 24, line 20 - page 25, line 6 figure 3B page 30, line 22 - page 31, line 1 page 31, line 27 - line 30 page 36 - page 37; example 6 page 38 - page 39; example 9 claims ----- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2007

Date of mailing of the international search report

26/09/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, Jean-François

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 92/20349 A (GENZYME CORP [US]) 26 November 1992 (1992-11-26) cited in the application example 23 claim 37	1
P,A	----- PARK ET AL: "N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 115, no. 1, 28 September 2006 (2006-09-28), pages 37-45, XP005663195 ISSN: 0168-3659 the whole document	1
A	----- US 2 931 753 A (CHESBRO RUTH M ET AL) 5 April 1960 (1960-04-05) column 2, line 20 - line 56 column 5, line 19 - line 20	1
A	----- ALAIN DURAND ET AL: "Neutral amphiphilic polysaccharides: chemical structure and emulsifying properties" COLLOID AND POLYMER SCIENCE ; KOLLOID-ZEITSCHRIFT UND ZEITSCHRIFT FÜR POLYMERE, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 284, no. 5, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 536-545, XP019340541 ISSN: 1435-1536 cited in the application the whole document	1
A	----- US 2001/021758 A1 (BARRITAU LT DENIS [FR] ET AL) 13 September 2001 (2001-09-13) cited in the application example 2 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2007/000595

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 32-34.
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

PCT Rule 39.1(iv) – method for treatment of the human body by surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5750678	A	12-05-1998	DE 4433101 A1	21-03-1996
			WO 9608517 A1	21-03-1996
			EP 0749447 A1	27-12-1996
WO 0016818	A1	30-03-2000	AT 284229 T	15-12-2004
			AU 6192299 A	10-04-2000
			CA 2344215 A1	30-03-2000
			DE 69922522 D1	13-01-2005
			DE 69922522 T2	15-12-2005
			EP 1115433 A1	18-07-2001
			US 6630457 B1	07-10-2003
			US 2004072793 A1	15-04-2004
WO 9220349	A	26-11-1992	AT 224916 T	15-10-2002
			AU 670030 B2	04-07-1996
			AU 2143492 A	30-12-1992
			AU 5226796 A	01-08-1996
			CA 2109502 A1	21-11-1992
			DE 69232790 D1	31-10-2002
			DE 69232790 T2	24-07-2003
			EP 0587715 A1	23-03-1994
			JP 6508169 T	14-09-1994
			JP 3425147 B2	07-07-2003
US 2931753	A	05-04-1960	NONE	
US 2001021758	A1	13-09-2001	AU 4913699 A	14-02-2000
			CA 2337328 A1	03-02-2000
			EP 1117695 A1	25-07-2001
			FR 2781485 A1	28-01-2000
			WO 0005270 A1	03-02-2000
			JP 2002521503 T	16-07-2002

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. C08B37/00 C08B15/06 C08B37/02 C08B37/04 C08B37/08
C08B37/14 A61K47/36

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 750 678 A (BAUER KURT H [DE] ET AL) 12 mai 1998 (1998-05-12) cité dans la demande colonne 2, ligne 49 - ligne 58; revendications	1
A	WO 00/16818 A1 (AESCHLIMANN DANIEL [GB]; BULPITT PAUL [GB]) 30 mars 2000 (2000-03-30) page 1, ligne 5 - ligne 18 page 9, ligne 25 - ligne 28 page 24, ligne 20 - page 25, ligne 6 figure 3B page 30, ligne 22 - page 31, ligne 1 page 31, ligne 27 - ligne 30 page 36 - page 37; exemple 6 page 38 - page 39; exemple 9 revendications	1



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 septembre 2007

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/09/2007

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, Jean-François

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 92/20349 A (GENZYME CORP [US]) 26 novembre 1992 (1992-11-26) cité dans la demande exemple 23 revendication 37	1
P,A	----- PARK ET AL: "N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 115, no. 1, 28 septembre 2006 (2006-09-28), pages 37-45, XP005663195 ISSN: 0168-3659 le document en entier	1
A	----- US 2 931 753 A (CHESBRO RUTH M ET AL) 5 avril 1960 (1960-04-05) colonne 2, ligne 20 - ligne 56 colonne 5, ligne 19 - ligne 20	1
A	----- ALAIN DURAND ET AL: "Neutral amphiphilic polysaccharides: chemical structure and emulsifying properties" COLLOID AND POLYMER SCIENCE ; KOLLOID-ZEITSCHRIFT UND ZEITSCHRIFT FÜR POLYMERE, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 284, no. 5, 1 février 2006 (2006-02-01), pages 536-545, XP019340541 ISSN: 1435-1536 cité dans la demande le document en entier	1
A	----- US 2001/021758 A1 (BARRITAU LT DENIS [FR] ET AL) 13 septembre 2001 (2001-09-13) cité dans la demande exemple 2 -----	1

Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n^{os} 32-34 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Méthode de traitement du corps humain par chirurgie ou thérapie (Règle 39.1(iv) PCT).
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5750678	A	12-05-1998	DE 4433101 A1	21-03-1996
			WO 9608517 A1	21-03-1996
			EP 0749447 A1	27-12-1996
WO 0016818	A1	30-03-2000	AT 284229 T	15-12-2004
			AU 6192299 A	10-04-2000
			CA 2344215 A1	30-03-2000
			DE 69922522 D1	13-01-2005
			DE 69922522 T2	15-12-2005
			EP 1115433 A1	18-07-2001
			US 6630457 B1	07-10-2003
			US 2004072793 A1	15-04-2004
WO 9220349	A	26-11-1992	AT 224916 T	15-10-2002
			AU 670030 B2	04-07-1996
			AU 2143492 A	30-12-1992
			AU 5226796 A	01-08-1996
			CA 2109502 A1	21-11-1992
			DE 69232790 D1	31-10-2002
			DE 69232790 T2	24-07-2003
			EP 0587715 A1	23-03-1994
			JP 6508169 T	14-09-1994
			JP 3425147 B2	07-07-2003
US 2931753	A	05-04-1960	AUCUN	
US 2001021758	A1	13-09-2001	AU 4913699 A	14-02-2000
			CA 2337328 A1	03-02-2000
			EP 1117695 A1	25-07-2001
			FR 2781485 A1	28-01-2000
			WO 0005270 A1	03-02-2000
			JP 2002521503 T	16-07-2002